

Die Typisierung humaner Stämme von *Achromobacter haemolyticus*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Antje Friederichs
aus Albersdorf

Marburg 1968

Die Typisierung humaner Stämme von *Achromobacter haemolyticus*



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Antje Friederichs
aus Albersdorf

Marburg 1968



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am: 1.2.1968

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Professor Dr.med. R.Siegert
Referent: Professor Dr.med. R.Siegert
Correferent: Professor Dr.med., Dr.med.dent.habil. H.Heuser

Herrn Professor Dr.med. R.Siegert danke ich für die Überlassung des Themas und Arbeitsplatzes sowie für sein Interesse an der Durchführung der Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr.med.W.Mannheim für die Anleitung zur experimentellen Arbeit und für seine ständige Hilfsbereitschaft.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Material und Methoden</u>	2
I Stämme	2
II Nährböden und kulturelle Technik	3
a) Medien	3
b) kulturelle Prüfung	4
c) biochemische Prüfung	4
III Serologische Technik	5
a) Immunisierung	5
b) Gewinnung von K-Faktorenseren	7
c) Herstellung von Antigensuspensionen für die Agglutination	7
d) Durchführung der Agglutinations- reaktionen	8
C. <u>Ergebnisse</u>	9
I Kulturell-biochemische Klassifizierung	9
a) Übersicht	
b) biotypische Gruppen	
II Serologische Typisierung	12
a) Bestimmung der O-Antigene	12
b) Bestimmung der K-Antigenfaktoren	12
c) Verteilung der O- und K-Faktoren bei 45 Stämmen	13
D. <u>Besprechung</u>	24
E. <u>Zusammenfassung</u>	26
F. <u>Literatur</u>	28

A. Einleitung

Aus humanmedizinischem Untersuchungsmaterial werden relativ häufig obligat aerob wachsende, unbegeißelte, kokkoide, gramnegative Diplobakterien isoliert, die unter den Bezeichnungen "Bacterium anitratum" (SCHAUB und HAUBER 1948), "B-5-W-Organismen" (STUART und Mitarb. 1949), "Moraxella lwoffii" (AUDUREAU 1940; PIECHAUD u. Mitarb. 1949), "Mima" bzw. "Herellea"-Arten (DE BORD 1939; 1942), "Diplococcus mucosus" (v. LINGELSHEIM 1906) im medizinischen Schrifttum bekannt sind. Diese Taxa sind teilweise als heterogen, teilweise als spätere Synonyma erkannt und auf eine Reihe neu definierter, untereinander nahe verwandter Spezies zurückgeführt worden (vgl. HENRIKSEN 1963; STENZEL u. MANNHEIM 1963). Die proteolytischen Vertreter dieser Gruppe wurden von MANNHEIM und STENZEL (1962) als *Achromobacter haemolyticus* klassifiziert. Während *A. conjunctivae* als biochemisch und serologisch einheitliches Taxon definiert ist, zerfällt *A. haemolyticus* in zwei Subspezies (subsp. *haemolyticus* und subsp. *alcaligenes*), die noch weitere biochemisch und serologisch fassbare Typen enthalten. Die taxonomische Stellung ähnlich definierter Einheiten wie *Achromobacter anitratum* var. *saponiphilum* (BILLING 1955) und der als proteolytische Varietäten von "Moraxella lwoffii" und "Moraxella glucidolytica" beschriebenen Keime (PIECHAUD und Mitarb. 1956) wurde im Vergleich zu *A. haemolyticus* bisher noch nicht untersucht. Über die normale Ökologie und die Frage der Pathogenität von *A.*

haemolyticus (und synonymer Taxa) ist wenig bekannt.

Es erschien daher wichtig, die kleinsten taxonomischen Einheiten (Bio- und Serotypen) innerhalb dieser Spezies zu bestimmen und diese mit den klinischen und Isolierungs-Daten in Beziehung zu setzen. Die vorliegende Untersuchung hatte die Aufgabe, eine - für das Untersuchungsgut des Hygiene-Instituts der Universität Marburg repräsentative - Serie von *A. haemolyticus*-Stämmen sorgfältig zu klassifizieren und mit Isolierungen anderer Untersuchungsstellen zu vergleichen. Die exakte Typenbestimmung ist die Voraussetzung für die Klärung der pathogenetischen, epidemiologischen und taxonomischen Fragen. Die hier vorgelegte Antigentabelle ist ferner im Hinblick auf eine Bearbeitung der chemischen Konstitution der Zellwand- und Kapselbestandteile von *A. haemolyticus* von Interesse.

B. Material und Methoden

I. Stämme

Die Untersuchungen bezogen sich auf je zwei in Heidelberg isolierte Stämme von *A. haemolyticus* (Nr. 10,305 NCTC und Nr. 10,306 NCTC) und *A. conjunctivae* (Nr. 10,304

NCTC und Nr. 231/61 HIH) sowie 37 Stämme von *A. haemolyticus*, die im diagnostischen Laboratorium des Hygiene-Instituts der Universität Marburg während der Jahre 1963 bis 1966 isoliert worden waren (siehe Tabelle 1).

Ferner wurden drei Stämme von *Moraxella glucidolytica* var. *liquefaciens* (Nr. 5367, 5371 und A 165 Institut Pasteur) und 1 Stamm *Moraxella lwoffii* var. *liquefaciens* (Nr. 53116 Institut Pasteur) wegen der vermuteten Synonymie der Taxa mit den Subspecies *haemolyticus* und *alcaligenes* von *A. haemolyticus* (c.f. MANNHEIM und STENZEL 1962, STENZEL und MANNHEIM 1963) verglichen.

Die Kulturen waren sofort nach der Isolierung lyophilisiert worden. Während der Untersuchung wurden Vorratskulturen auf Trypt. Soy-Agar (B.B.L.) bei 4° C gehalten.

II. Nährböden und kulturelle Technik

a) Medien

1. Trypticase-Soy-Agar (Baltimore Biological Laboratory, Inc.)
2. 5 % Hammelblut in Medium(1) ("Blutagar")
3. Fuchsin-Lactose-Agar nach ENDO
4. Desoxycholat-Citrat-Agar nach LEIFSON
5. KLIGLER-Agar (B.B.L.)
6. Medien der "Bunten Reihe" (KAUFMANN 1954), Indolbildung und Beweglichkeitsprüfung in Trypsin-Bouillon.

7. Ammonium-Aethanolmedium:Ammoniumbasis KAUFFMANN

1954, Aethanol 0,05 molar, sterilfiltriert.

b) Kulturelle Prüfung

Nach 24-stündiger Bebrütung der Kulturen auf Blutagar bei 22° C, 37° C und 45° C wurden die Nährbodenveränderungen und Stärke des Wachstums notiert. Zur Herstellung des Gram-Präparates und zur Prüfung der Cytochromoxydase-Reaktion mit Nadi-Reagenz wurde die 37° C-Kultur weiter verwendet. Die 22° C-Platte wurde noch auf Kolonie- und Nährbodenveränderungen weitere 48 Stunden lang beobachtet. Die Beurteilung des Wachstums auf Endo- und Desoxycholat-Citrat-Agar erfolgte nach 48-stündiger Bebrütung. Die Fähigkeit zur oxydativen Kohlehydratspaltung wurde anhand des Kligler-Agars überprüft, die Beweglichkeit im Vitalpräparat ("Hängender Tropfen") aus einer 22° C-Kultur in Trypsinbouillon. Ausserdem wurde Stichagar zur Beweglichkeitsprüfung herangezogen.

c) Biochemische Prüfung

Eine "Bunte Reihe", die aus den flüssigen Medien zum Nachweis von Indolbildung, Harnstoffspaltung und Nitratreduktion, sowie Peptonwasser-Bromthymolblau-Medien mit jeweils 0,5 - 1% eines Zuckers, Zuckeralkohols oder Glykosids und Ammoniumsubstraten bestand, wurde entsprechend der in der Enterobacteriaceen-Diagnostik üblichen Technik (KAUFFMANN 1954) verwendet. Die Bildung von Schwefelwasserstoff wur-

de - ausser in Kligler-Eisen-Agar - mit Bleiacetatpapier "Merck" über Trypsinbouillon-Kulturen geprüft. Die Prüfung von H_2S - und Indolbildung erfolgte nach 24-stündiger Bebrütung bei $37^{\circ}C$. Alle übrigen Medien der "Bunten Reihe" standen 3 Tage lang bei $37^{\circ}C$ im Brutschrank und wurden anschliessend 30 Tage lang bei Zimmertemperatur beobachtet. Zweifelhafte und verzögerte Reaktionen wurden sowohl bei $37^{\circ}C$ als auch bei $22^{\circ}C$ wiederholt, weil das Wachstumsoptimum und das biochemische Leistungsoptimum nicht zusammenfallen müssen.

III. Serologische Technik

a) Immunisierung

Kaninchen-Hyperimmunseren wurden durch wiederholte Injektionen mit formalin-inaktivierten Achromobacter-Suspensionen hergestellt. Zur Immunisierung dienten folgende Achromobacter-Stämme:

Nr. 231/61 HIH (Conjunctiva)

Nr. 2446/61 HIH (Sputum)

Nr. 5371 I.P. (méningite)

Nr. 53116 I.P. (ulcération)

Nr. 5367 I.P. (ulcération)

Nr. 92-2 HIM (Urin)

Nr. 59-3 HIM (Galle)

Nr. 38-3 HIM (Urin)

Nr. 2181/61 HIH (Sputum)

Schrägagar-Kulturen dieser Stämme, die ca. 24 Stunden bei 37°C gewachsen waren, wurden mit Kochsalzlösung abgeschwemmt, die Suspensionen turbidimetrisch (Transmission bei 578 μ m) auf eine Dichte von etwa 0,8 mg Trockensubstanz pro ml eingestellt und mit Formalin (0,5%) versetzt. In 3 bis 5-tägigen Abständen wurden diese Suspensionen in ansteigenden Mengen nach folgendem Schema den ca. 2 kg schweren Tieren intravenös injiziert:

a. Probeentnahme vor Immunisierung

- 1. Tag 0,4 ml i.v.
- 4. Tag 0,6 ml i.v.
- 7. Tag 1,2 ml i.v.
- 10. Tag 2,5 ml i.v.
- 13. Tag 5,0 ml i.v.

b. Probeentnahme

- 16. Tag 5,0 ml i.v.
- 19. Tag 5,0 ml i.v.
- 24. Tag entblutet.

Vor der Immunisierung sowie nach insgesamt 5 Injektionen erfolgten Probeentnahmen, um den Anstieg des Agglutinationstiters im Serum festzustellen. Er erreichte in allen Fällen mehr als 1/5000. Die Entblutung der Tiere erfolgte in Nembutal-Narkose (40 mg/kg i.v.) 4 bis 5 Tage nach der letzten Injektion. Die Seren wurden mit Glycerin im Verhältnis 1:1 versetzt und im Kühlschrank bei + 4°C aufbewahrt.

b) Gewinnung von K-Faktorenseren

Dicht beimpfte und 24 Stunden bei 37°C bebrütete Trypt. Soy-Agar-Kulturen wurden mit wenig Kochsalzlösung abgeschwemmt, der Merthiolat im Verhältnis 1:10 000 zugesetzt war. Nach Zentrifugieren der Suspensionen wurde das Sediment mit dem zu absorbierenden Serum in einer Verdünnung von 1:25 versetzt und eine Stunde bei 37°C im Schüttelapparat bebrütet. Über Nacht wurden sie bei + 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und dann in der Kühlzentrifuge klar zentrifugiert (5°C, 20 Min., 14000xg).

c) Herstellung von Antigensuspensionen für die Agglutination

Die Herstellung des O-Antigens erfolgte in folgender Weise: 24 Stunden bei 37°C gewachsene Trypticase-Soy-Agar-Kulturen wurden mit 0,9%iger Kochsalzlösung abgeschwemmt und die Suspensionen eine Stunde lang im Dampftopf auf 100°C erhitzt. Anschliessend wurden die Antigensuspensionen zweimal mit 0,45%iger Kochsalzlösung bei 14000 xg zentrifugiert, danach resuspendiert und turbidimetrisch auf eine Dichte von ca. 0,2 mg Trockensubstanz/ml eingestellt.

Das K-Antigen ist folgendermassen gewonnen worden:

24 Stunden bei 37°C gewachsene Trypticase-Soy-Agar-Kulturen wurden mit 0,9%iger Kochsalzlösung abgeschwemmt und dann zentrifugiert. Das resuspendierte Sediment wurde auf eine Dichte von ca. 0,2 mg Trockensubstanz/ml

eingestellt, und, lebend oder mit Formalin (0,5%) oder mit Merthiolat (1:10 000) versetzt, bei + 4°C aufbewahrt.

d) Durchführung der Agglutinationsreaktionen

Für die Objektträger-Agglutination wurden absorbierte Seren in einer zuvor ermittelten Gebrauchsverdünnung, meist 1:100 bzw. 1:50, verwendet. Als "Antigen" dienten 24 Stunden alte 37°C-Kulturen, die von Trypticase-Soy-Agar oder Blutagar stammten. Ein grosser Teil der Stämme hatte visköse Koloniebeschaffenheit. Deshalb wurden diese Kolonien zunächst in einem Tropfen 0,9%iger Kochsalzlösung suspendiert und dann dem Serumtropfen mit Kapillaren zugesetzt. Gleichzeitig wurde die Suspensionsstabilität der Kulturen in 0,9%iger Kochsalzlösung überprüft.

Zur Röhrchen-Agglutination wurden Serumverdünnungsreihen mit physiologischer Kochsalzlösung folgendermassen angesetzt: In das jeweils erste Röhrchen kamen 1,2 ml Kochsalzlösung, in alle folgenden samt Kontrolle 0,5 ml. Dann wurde ein Tropfen (0,05 ml) Serum in das erste Röhrchen gegeben (Verdünnung 1:25), gut durchgemischt, davon 0,5 ml in das nächste usw., bis zum vorletzten Röhrchen, übertragen, aus dem 0,5 ml verworfen wurden. Anschliessend kam in jedes Röhrchen 0,5 ml Antigen. Die Endverdünnungen betragen 1:50, 1:100 ect,

Die Resultate wurden makroskopisch nach einer Reaktionszeit von 6 Stunden in einem Wasserbad von 50°C abgelesen.

C. Ergebnisse

I. Kulturell-biochemische Klassifizierung

Die biochemischen Eigenschaften der untersuchten 35 Stämme sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Eine vorläufige Einteilung des Keimmaterials ergab sich aus folgenden Kriterien, die frühzeitig erkennbar waren: Negative Cytochromoxydase-Reaktion, Haemolyse auf Hammelblutagar, Säurebildung aus Glucose, Alkalisierung von Ammoniumcitrat, Nitratreduktion und Indolbildung. Auf Grund ihres unterschiedlichen Verhaltens gegen Glucose können auf diese Weise 2 sog. biotypische Gruppen haemolysierender *Achromobacter*-Stämme unterschieden werden, die weitgehend einheitlich, bei Prüfung einer grösseren Zahl von Merkmalen aber nicht homogen sind (Gruppe 2 und 3 nach MANNHEIM und STENZEL 1962).

Die Gruppe 2 wurde in die Untergruppen 2a und 2b unterteilt, wobei folgende Kriterien hinzukamen: Säurebildung aus Galactose, Arabinose, Xylose, Lactose, Rhamnose, Wachstum auf Desoxycholat-Citrat-Agar nach LEIFSON und Wachstum in Ammonium-Aethanol. In Tabelle 3a sind die Definitionen dieser Gruppen aufgeführt. Die biotypischen Keimgruppen enthalten jeweils eine grössere Zahl von Stämmen, die in ihren biochemischen Reaktionen identisch waren (Tabellen 3a und 3b).

Der Untergruppe 2a entsprachen 9 Stämme:

Nr. 10,304 NCTC, Nr. 231/61 HIH, Nr.45-4 HIM, Nr. 60-3 HIM,
Nr. 91-8 HIM, Nr. 08 HIM, Nr. 37-1 HIM, Nr.91-3 HIM,
Nr. 92-2 HIM.

Die Kolonien dieser Stämme hatten haemolytische Höfe. Bei 37°C trat die Haemolyse nach ungefähr 18 Stunden, bei Zimmertemperatur erst nach 2 Tagen auf. Das Wachstumsop-
timum lag zwischen 22°C und 37°C. Bei 45°C erfolgte kein Wachstum. Auf ENDO-Agar wuchsen die Kolonien üppig und zeigten himbeerrote Färbung durch Fuchsin einlagerung. Auf Desoxycholat-Citrat-Agar nach LEIFSON erfolgte kein Wachstum. Glucose wurde prompt, Arabinose, Xylose und Galactose etwas verzögert gespalten, Lactose spät und unregelmässig gesäuert, Maltose und Rhamnose niemals angegriffen, Ammonium-Citrat im Laufe von 3-6 Tagen alkali-
siert. Nitratreduktion und Indolbildung waren nicht nachweisbar. H₂S wurde gebildet, Harnstoff nicht alkalisiert. Es erfolgte kein Wachstum in Ammonium-Aethanol.

Der Untergruppe 2b entsprachen 4 Stämme:

Nr. 10,305 NCTC, Nr. 88-2 HIM, Nr. 30-2 HIM, Nr. 91-5 HIM.

Die Stämme dieser Gruppe zeigten ebenfalls Haemolyse, bei 37°C früher als bei Zimmertemperatur. Ihr Wachstums-
optimum lag näher bei 37°C als bei 22°C, bei 45°C waren sie nicht kultivierbar. Auf ENDO-Agar erfolgte üppiges Wachstum und Rotfärbung. Auf Desoxycholat-Citrat-Agar wuchsen die Stämme in grossen, flachen, farblosen Kolonien. Sie verhielten sich biochemisch ähnlich wie die Stämme

der Gruppe 2a. Lactose wurde verzögert, Rhamnose spät und unregelmässig gesäuert. Alle Stämme zeigten Wachstum in Ammonium-Aethanol.

Der Definition der Gruppe 3 entsprachen 14 Stämme:

Nr. 10,306 NCTC, Nr. 36-5 HIM, Nr. 92-8 HIM,
Nr. 39-2 HIM, Nr. 67-2 HIM, Nr. 94-5 HIM,
Nr. 74-4 HIM, Nr. 43-2 HIM, Nr. 91-6 HIM,
Nr. 70-2 HIM, Nr. 53116 I.P., Nr. 28-1 HIM,
Nr. 51-1 HIM, Nr. 85-3 HIM.

Diese Stämme standen in ihren kulturell-biochemischen Eigenschaften der Gruppe 2 sehr nahe, es fehlte ihnen aber die Säurebildung aus Kohlenhydraten.

Das Wachstumsoptimum lag zwischen 22°C und 37°C, bei 45°C erfolgte kein Wachstum. Haemolyse trat bei allen Stämmen auf. Indolbildung und Nitratreduktion waren immer negativ. Ammonium-Citrat wurde stets alkalisiert. Auf ENDO-Agar wuchsen himbeerrote Kolonien, Desoxycholat-Citrat-Agar wurde nur von einigen Stämmen bewachsen. Glucose und andere Kohlenhydrate wurden nicht angegriffen. Harnstoffspaltung war nur bei einem Stamm (Nr. 74-4 HIM) nach 3 Tagen nachweisbar. Schwefelwasserstoff wurde, mit Ausnahme des Stammes Nr. 70-2 HIM, von allen Stämmen gebildet. Ammonium-Aethanol wurde von 8 Stämmen bewachsen, 6 Stämme zeigten kein Wachstum innerhalb von 6 Monaten.

II. Serologische Typisierung

a) Bestimmung der O-Antigene

Die Keime der Haemolyticus-Gruppe haben eine strukturlose, hochantigene Hüllsubstanz (K-Antigen, MANNHEIM 1962), welche die thermostabilen zellwandgebundenen Antigene (O-Antigene) überlagert. Durch einstündiges Erhitzen auf 100°C kann diese Hüllsubstanz (K-Antigen) in Lösung gebracht werden. Da die gelöste Hüllsubstanz durch die Wärmebehandlung in ihrer Readsorptions- und Antikörperbindungsfähigkeit kaum beeinträchtigt wird, ist es erforderlich, die erhitzten Bakterien sorgfältig zu waschen, um reine "O-Antigen"-Suspensionen zu erhalten. Die O-Agglutination in den durch Immunisierung von Kaninchen erhaltenen OK-Seren, durchgeführt in einem bewegten Wasserbad für 6 Stunden bei 50°C , ist kräftig, grobkörnig, mit scharfer Begrenzung des Endtiters, bei relativ geringer Titerhöhe (Tabellen 4a und 4b). Es konnten neun O-Antigenspezifitäten definiert werden. Kreuzbeziehungen zwischen Stämmen aus verschiedenen O-Gruppen sind selten.

b) Bestimmung der K-Antigenfaktoren

Die K-Agglutination lebender oder in Merthiolat (1:10 000) oder Formalin (0,5%) inaktivierter Keime im Wasserbad (50°C) ist - im Gegensatz zur K-Agglutination der Enterobacteriaceen - grossflockig, leicht zerschüttelbar und hochtitrig (Tabelle 5b). Die Hüllsubstanz hat - im Gegensatz zu dem relativ einheitlichen

O-Antigen komplexe serologische Eigenschaften. Gemeinsame K-Antigenanteile bewirken Kreuzreaktionen zwischen Stämmen von *A. conjunctivae* und verschiedenen K-Typen von *A. haemolyticus*. Durch Absättigung der Rohseren (MANNHEIM 1963) wurden 6 K-Antigenfaktoren ermittelt. (Tabelle 5a) Die Faktorenseren wurden zur Typisierung lebender Bakterien aus ca. 20-stündigen Oberflächenkulturen von Hammelblutagar oder Trypticase-Soy-Agar (B.B.L.) (37°C) durch Objektträgeragglutination benutzt.

c) Verteilung der O- und K-Faktoren bei 45 Stämmen

Die serologischen Reaktionen der 45 untersuchten Stämme sind in Tabelle 6 aufgeführt. Der grösste Teil der Stämme regierte mit einem der K-Faktorenseren, nur ein Stamm (Nr. 116-2 HIM) mit zwei K-Faktorenseren. 5 Stämme konnten mit den vorhandenen K-Faktorenseren nicht typisiert werden. Die Hälfte der untersuchten Stämme wies Beziehungen zu einer der beschriebenen O-Gruppen auf, ein Stamm (Nr. 97-1 HIM) hatte Beziehungen zu zwei O-Gruppen. Das vorliegende Keimmaterial dürfte also noch eine grössere Zahl nicht erfasster O-Antigenspezifitäten enthalten, jedoch nur wenige unbekannte K-Antigenfaktoren. Durch freie Kombination dieser Eigenschaften ergäbe sich eine grosse Zahl von Serotypen. Am häufigsten angetroffen wurden die Kombinationen 5:b (3x), 9:b (4x), 4:c (5x) und 1:a (2x).

Tabelle 1: Art und Herkunft der geprüften Stämme

Original-Nr.	Spezies	Herkunft
88-2	HIM A. haemolyticus	Sputum
92-8	HIM " "	Bronchus_Sekret
91-8	HIM " "	Sputum
67-2	HIM " "	Tonsillen-Abstr.
36-5	HIM " "	Sputum
39-2	HIM " "	Rachen-Abstr.
45-4	HIM " "	Sputum
60-3	HIM " "	"
10,305	NCTC " "subsp. haemolyticus	"
10,306	NCTC " "subsp. alcaligenes	"
10,304	NCTC A. conjunctivae	Conjunctiva
231/61	HIM " "	"
85-3	HIM A. haemolyticus	Urin
92-2	HIM " "	"
91-5	HIM " "	"
91-3	HIM " "	"
30-2	HIM " "	"
37-1	HIM " "	"
38-3	HIM " "	"
51-1	HIM " "	"
52-3	HIM " "	"
91-6	HIM " "	Duodenalsaft
79-1	HIM " "	Ohrabstr.
74-4	HIM " "	Wundabstr.
70-2	HIM " "	Duodenalabstr.
28-1	HIM " "	Urin
43-2	HIM " "	Nagelbett-Abstr.
45-3	HIM " "	Portio-Abstr.
59-3	HIM " "	Galle
08	HIM " "	Duodenalsaft
53116	I.P. Moraxella lwoffii liquefaciens	ulcération int.
5371	I.P. Morax. glucidolyt. v. liquefac.	méningite
A 165	I.P. Morax. gluc. v. liquef.	gorge
5367	I.P. Morax. gluc. v. liquef.	ulcération intest.
94-5	HIM A. haemolyticus	Gehörgang
104-3	HIM " "	Wundabstrich
104-1	HIM " "	Stuhl
118-2	HIM " "	Urin
116-2	HIM " "	"
123-5	HIM " "	"
127-6	HIM " "	"
128-3	HIM " "	"
128-6	HIM " "	"
130-2	HIM " "	"
130-1	HIM " "	"

Tabelle 2: Biochemische Reaktionen von A. haemolyticus (33 Stämme)
und A. conjunctiva (2 Stämme aus menschlichem Unter-
suchungsmaterial.

Stamm-Nr.	patholog. Begleit- flora	Haemolyse	KLIGLER	Indol	Harnstoff	Amm. Citrat	KNO ₃ -Redukt. H ₂ S-Bildg.	22°C 37°C Blutagar 45°C	LEIFSON	ENDO	Amm.-Aethanol	Glucose	Maltose	Arabinose	Rhamnose	Galactose	Xylose	Lactose
88-2	+	+	r	-	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
92-8	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
91-8	+	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
67-2	-	(+)	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
36-5	+	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
39-2	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45-4	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60-3	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22-2	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
23-1	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
25-5	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
99-1	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
85-3	+	+	r	-	-	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
92-2	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
91-5	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
91-3	+	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
30-2	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
37-1	+	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
38-3	+	(+)	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
51-1	+	+	0	-	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
52-3	+	(+)	r	-	-	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
91-6	+	+	r	-	-	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
79-1	-	(+)	0	-	-	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
74-4	+	+	r	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
70-2	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28-1	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43-2	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45-3	+	(+)	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
59-3	+	+	0	-	-	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
08	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37-2	-	+	r	-	-	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100-2	-	+	r	-	-	+	(+)	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+
100-1	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37-4	-	+	0	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
94-5	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
104-3	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
104-1	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
118-2	+	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
116-2	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
123-5	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
127-6	-	+	r	-	-	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
128-3	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
128-6	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
130-2	-	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
130-1	+	+	r	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = positiv im Sinne der Reaktion
- = negativ im Sinne der Reaktion
(+) = verzögert positiv

r = rot
0 = orange (Schrägfläche)
--- = Stichkanal, H₂S, Gas

Tabelle 3a: Definition biotypischer Gruppen von A. haemolyticus

	Gruppe 2a	Gruppe 2b	Gruppe 3
Oxydase	-	-	-
Haemolyse	+	+	+
Indolbildung	-	-	-
Nitratreduktion	-	-	-
Amm. citrat (Alkal.)	+	+	+
Säure aus Glycose	+	+	-
" " Galactose	+	+	
" " Arabinose	+	+	
" " Xylose	+	+	
" " Lactose	<u>+</u>	(+)	
" " Rhamnose	-	<u>+</u>	
Wachstum auf LEIFSON	-	+	
Wachstum in Amm. Aethanol	-	+	

Tabelle 3b: Gegenüberstellung von biochemischer Klassifikation und Isolierungsdaten von 45 proteolytischen Achromobacter-Stämmen aus menschlichem Untersuchungsmaterial

Stamm-Nr.	Material	Biotyp. Gruppen
10,304 NCTC	Conjunctiva	2a
231/61 HIH	"	2a
10,305 NCTC	Sputum	2b
10,306 NCTC	"	3
36-5 HIM	"	3
45-4 HIM	"	2a
60-3 HIM	"	2a
91-8 HIM	"	2a
88-2 HIM	"	2b
92-8 HIM	Bronchus Sekret	3
39-2 HIM	Rachenabstrich	3
67-2 HIM	"	3
A 165 I.P.	gorge	-
5371 I.P.	méningite	-
79-1 HIM	Otitis media	-
94-5 HIM	Gehörgang	3
74-4 HIM	Wundabstrich	3
43-2 HIM	"	3
08 HIM	Duodenalsaft	2a
91-6 HIM	"	3
70-2 HIM	"	3
59-3 HIM	"	-
53116 I.P.	ulcération intestinale	3
5367 I.P.	"	-
45-3 HIM	Kolpitis	-
28-1 HIM	Urin	3
30-2 HIM	"	2b
37-1 HIM	"	2a
38-3 HIM	"	-
51-1 HIM	"	3
52-3 HIM	"	-
85-3 HIM	"	3
91-3 HIM	"	2a
91-5 HIM	"	2b
92-2 HIM	"	2a

Tabelle 4a: Definition der O-Antigene

<u>Antigen</u> ¹	<u>Antiserum</u> ²
1	10,304 NCTC ³
2	10,305 NCTC
3	10,306 NCTC
4	92-2 HIM
5	38-3 HIM
6	59-3 HIM
7	53116 I.P.
8	5371 I.P.
9	5367 I.P.

-
1. 1 Std. auf 100⁰C erhitzte und gewaschene Bakterien, Röhrchenagglutination im Wasserbad bei 52⁰C. Antigene 1-3 cf. MANNHEIM 1962.
 2. Kaninchenserum, präpariert mit lebenden, formalin- oder merthiolate-inaktivierten Bakterien (rohe OK-Seren).
 3. NCTC = National collection of type cultures, London;
HIM = Hygiene-Institut der Universität Marburg;
 4. I.P. = Institut Pasteur, Paris.

Tabelle 5a: Definition der K-Antigenfaktoren

Faktor	Antiserum ¹	absorbiert mit ²
"a"	10,304 NCTC	10,305 NCTC
"b"	10,305 NCTC	10,304 NCTC
"c"	92-2 HIM	38-3 HIM
"d"	53116 I.P.	38-3 HIM
"e"	5371 I.P.	59-3 HIM
"f"	A 165 I.P.	-

1. OK-Seren, cf. Tab. 4a.

2. Erschöpfende Absorption mit 12- bis 20-stündigen
Oberflächenkulturen (Trypt. Soy-Agar B.B.L., 37⁰C).

Tabelle 5b: Typisierung des Hüllantigens mit Faktorensereen
(Titer der Röhrchenagglutination bei 50⁰C)

Antigen ¹	Antiseren					
	a	b	c	d	e	f
10,304 NCTC	1280	-	-	-	-	-
10,305 NCTC	-	1280	-	-	-	-
92-2 HIM	-	-	5000	-	-	-
53116 I.P.	-	-	-	2560	-	-
5371 I.P.	-	-	-	-	320	-
A 165 I.P.	-	-	-	-	-	640

1. 12- bis 20-stündige Trypt. Soy-Agarkulturen (37⁰C),
lebend oder in Formalin (0,5%) oder Merthiolat (1:10.000).

Tabelle 6: Serologische Reaktionen von A. haemolyticus
(43 Stämme) und A. conjunctivae (2 Stämme)
aus menschlichem Material

Stamm-Nr.	Material	O-Gruppe	K-Typ
88-2	HIM Sputum	-	b
92-8	HIM Bronchussektret	-	c
91-8	HIM Sputum	7	c
67-2	HIM Tonsillenabstrich	-	b
36-5	HIM Sputum	-	-
39-2	HIM Rachenabstrich	-	c
45-4	HIM Sputum	4	c
60-3	HIM "	-	c
10,305	NCTC "	2	b
10,306	NCTC "	3	b
10,304	NCTC Conjunctiva	1	a
231/61	HIH "	1	a
85-3	HIM Urin	-	c
92-2	HIM "	4	c
91-5	HIM "	-	b
91-3	HIM "	4	c
30-2	HIM "	-	d
37-1	HIM "	-	c
38-3	HIM "	5	b
51-1	HIM "	-	-
52-3	HIM "	-	b
91-6	HIM Duodenalsaft	-	instabil
79-1	HIM Ohabstrich	5,9	b
74-4	HIM Wundabstrich	-	d
70-2	HIM Duodenalsaft	-	-
28-1	HIM Urin	5	c
43-2	HIM Nagelbettabstrich	5	-
45-3	HIM Portio-Abstrich	4	c
59-3	HIM Galle	6	b
08	HIM Duodenalsaft	4	c
53116	I.P. ulcération intestinale	7	d
5371	I.P. méningite	8	e
A 165	I.P. gorge	6	f
5367	I.P. ulcération intestinale	9	b
94-5	HIM Gehörgang	5	b
104-3	HIM Wundabstrich	-	-
104-1	HIM Stuhl	-	d
118-2	HIM "	-	c
116-2	HIM "	8	a, b
123-5	HIM "	-	c
127-6	HIM "	-	c
128-3	HIM "	-	c
128-6	HIM "	-	c
130-2	HIM "	9	b
130-1	HIM "	9	b

Tabelle 7: Beziehungen zwischen Serotyp und Biotyp bei 45 unbegeißelten, proteolytischen Achromobacter-Stämmen

Stamm-Nr.	Material	Biochemie	O-Gruppe	K-Faktor
10,304 NCTC	Conjunctiva	2a	1	a
231/61 HIH	"	2a	1	a
10,305 NCTC	Sputum	2b	2	b
10,306 NCTC	"	3	3	b
92-2 HIM	Urin	2a	4	c
91-3 HIM	"	2a	4	c
45-3 HIM	Portio-Abstrich	-	4	c
08 HIM	Duodenalsaft	2a	4	c
38-3 HIM	Urin	-	5	b
54-5 HIM	Gehörgang	3	5	b
79-1 HIM	Ohrabstrich	-	5,9	b
28-1 HIM	Urin	3	5	c
43-2 HIM	Nagelbettabstrich	3	5	-
59-3 HIM	Galle	-	6	b
A 165 I.P.	gorge	-	6	f
91-8 HIM	Sputum	2a	7	c
53116 I.P.	ulcération intestinale	3	7	d
116-2 HIM	Stuhl	.	8	a,b
5371 I.P.	méningite	-	8	e
5367 I.P.	ulcération intestinale	-	9	b
130-2 HIM	Stuhl	.	9	b
130-1 HIM	"	.	9	b
88-2 HIM	Sputum	2b	-	b
67-2 HIM	Tonsillen-Abstrich	3	-	b
91-5 HIM	Urin	2b	-	b
52-3 HIM	"	-	-	b
92-8 HIM	Bronchussekret	3	-	c
39-2 HIM	Rachenabstrich	3	-	c
60-3 HIM	Sputum	2a	-	c
85-3 HIM	Urin	3	-	c
37-1 HIM	"	2a	-	c
118-2 HIM	Stuhl	.	-	c
123-5 HIM	"	.	-	c
127-6 HIM	"	.	-	c
128-3 HIM	"	.	-	c
128-6 HIM	"	.	-	c
30-2 HIM	Urin	2b	-	d
74-4 HIM	Wundabstrich	3	-	d
104-1 HIM	Stuhl	.	-	d

D. Besprechung

Die vorliegenden Befunde ergeben ein provisorisches Antigen-schema für die Gruppe der unbeweglichen haemolysierenden *Achromobacter*-Stämme. Es wurde von den verwendeten Immunsereen zwar nur ein Teil der bei den 45 untersuchten Stämmen tatsächlich vorhandenen Faktoren erfasst, jedoch wurde zweifelsfrei gezeigt, dass derartige Keime durch Nachweis je eines gruppenspezifischen O-Antigens sowie eines typenspezifischen K-Partialantigens identifiziert werden können.

Die Antigen-Eigenschaften a und c stehen auffallend in Korrelation zu dem Fehlen der Fähigkeit, in Ammonium-Aethanol und auf Desoxycholat-Citrat-Agar zu wachsen, während die Eigenschaften b und d mit dem Vorhandensein dieser Fähigkeit übereinstimmen. Die Säurebildung aus Kohlenhydraten wechselt bei den Vertretern der K-Typen b, c und d; die drei Kulturen des Typs 9:b und die fünf Kulturen des Typs 4:c verhalten sich jedoch hinsichtlich der Glucosespaltung einheitlich.

Durch Klassifizierung der O- und K-Antigen-Eigenschaften erhält man also bei *Achromobacter haemolyticus* var. *haemolyticus* biochemisch und serologisch homogene Einheiten von infrasubspezifischem Rang.

Es ist wahrscheinlich, dass *Achromobacter mucosus* und verwandte Spezies (c.f. STENZEL und MANNHEIM 1963) Zellhüllen des gleichen Bauprinzips wie *A. haemolyticus* aufweisen und dass die durch Alkalibehandlung bei Vertretern von

A. mucosus erhaltenen Antigenspezifitäten (CARY 1961) dem durch Erhitzen freigelegten O-Antigen von *A. haemolyticus* und *A. conjunctivae* entsprechen.

Die als *Moraxella glucidolytica* var. *liquefaciens* und *Moraxella lwoffii* var. *liquefaciens* (PIÉCHAUD et al. 1956) klassifizierten französischen Stämme erweisen sich sowohl im kulturell-biochemischen Verhalten als auch durch den Besitz gemeinsamer O- und K-Antigene als Angehörige der Subspezies *haemolyticus* bzw. *alcaligenes* von *A. haemolyticus*. Die untersuchten Vertreter sind jedoch, ebenso wie die des synonymen Taxon, serologisch heterogen.

Eine klare Beziehung zwischen Serotyp und Lokalisation im Wirtsorganismus ist bei den in Tabelle 6 aufgeführten *Achromobacter*-Stämmen nicht zu erkennen. Aus Konjunktiva isolierte Stämme gehören dem Serotyp 1a, Stämme aus Sputum den Typen 2b, 3b, 4c und 7c, Stämme aus Duodenalsaft den Typen 4c und 6b und Stämme aus Urin den Serotypen 5c, 5b, 4c, 8a, b und 9b an. Ebensowenig besteht eine Beziehung zwischen Biotyp und Lokalisation im Wirtsorganismus. Die biotypische Gruppe 2a enthält Keimmateriel aus Sputum, Conjunktiva, Urin, und Duodenalsaft, die biotypische Gruppe 2b Stämme aus Sputum und Urin und die biotypische Gruppe 3 enthält Keimmateriel aus Bronchussektret, Rachenabstrich, Sputum, Urin, Duodenalsaft, ulcération intestinale, Gehörgang und Wundabstrich. Dagegen ist eine Abhängigkeit der Isolierungsfrequenz eines Serotyps von der geographischen Verbreitung, also von der Umwelt des Wirts, nicht auszuschliessen. Sämtliche Kulturen mit der Eigenschaft c

wurden im Marburger Laboratorium, die Stämme mit den Eigenschaften e und f nur in Paris isoliert. Die Verteilung der Eigenschaften b und d ist unabhängig vom Isolierungs-ort.

Angesichts der Unvollständigkeit der Antigentabelle und der kleinen Zahl der untersuchten Kulturen können diese Überlegungen allerdings nur vorläufiger Art sein.

E. Zusammenfassung

Es wurde für *Achromobacter haemolyticus* MANNHEIM und STENZEL 1962 und für *Achromobacter conjunctivae* MANNHEIM und STENZEL 1962 eine provisorische Antigen-Tabelle mit 9 gruppenspezifischen O-Antigenen und 6 typenspezifischen K-Antigenfaktoren aufgestellt. Mit Hilfe dieser Kriterien war es möglich, eine grosse Zahl von Stämmen aus menschlichem Untersuchungsmaterial zu klassifizieren, und zwar 39 Stämme hinsichtlich des K-Typs und 23 Stämme hinsichtlich der O-Gruppe. *Moraxella glucidolytica* var. *liquefaciens* PIÉCHAUD et al. 1956 und *Moraxella lwoffii* var. *liquefaciens* PIÉCHAUD et al. 1956 sind synonym mit *A. haemolyticus* STENZEL und MANNHEIM 1963 bzw. *A. haemolyticus* subsp. *alcaligenes* MANNHEIM und STENZEL 1962.

Die gleichen *Achromobacter*-Stämme wurden biochemisch untersucht. Die Serotypen von *A. haemolyticus* erwiesen

sich als biochemisch einheitliche, infrasubspezifische
Taxa.

Eine deutliche Beziehung zwischen Serotyp, Biotyp und
Lokalisation im Wirtsorganismus war nicht festzustellen.
Es ergaben sich hingegen Hinweise dafür, dass die Sero-
typen von *A. haemolyticus* regional, also in Abhängigkeit
von der Umwelt des Wirts, gehäuft auftreten können.

F. Literatur

- AUDUREAU, A. : Etude du genre *Moraxella* Ann.Inst.
Pasteur 64, 126-172 (1940)
- BILLING, E. : Studies on soap-tolerant organisms:
a new variety of *Bacterium anitratum*
J.gen.Microbiol. 13, 252-264 (1955).
- CARY, S.C. : Serological relationship of *Mimea*, *Mo-*
raxella, *Diplococcus mucosus* and *Neis-*
seria winogradskyi. Internat.Bullet.
Bact.Nomencl. 11, 79-85 (1961)
- DE BORD, G. : Organisms invalidating the diagnosis
of gonorrhea by the smear method.
J.Bact. 38, 119-120 (1939)
- DE BORD, G. : Descriptions of *Mimeae* trib. nov. with
three genera and three species and
two new species of *Neisseria* from
conjunctivitis and vaginitis.
Iowa J.Sci. 16, 471-480 (1942).
- HENRIKSEN, S.D. : *Mimeae*. The standing in nomenclature
of the names of this tribes and of its
genera and species.
Internat.Bull.Bact.Nomencl. 13, 51-56
(1963)
- KAUFFMANN, F. : *Enterobacteriaceae*, 2nd Ed., Munksgaard,
Kopenhagen, 1954.

VON

LINGELSHEIM, W.: Die bakteriologischen Untersuchungen der
Kgl.Hg.Station zu Beuthen O.-Schl. wäh-
rend der Genickstarre-Epidemie in Ober-
schlesien im Winter 1904/05.

Klin.Jb. 15, 373-488 (1906)

MANNHEIM, W. : Serologische Untersuchungen an unbeweg-
lichen, haemolysierenden Achromobacter-
stämmen aus Konjunctiva und Respirations-
Zbl.Bakt.I Orig.186, 528-543 (1962) trakt.

MANNHEIM, W. und

W.STENZEL : Zur Systematik der obligat aeroben gram-
negativen Diplobakterien des Menschen.
Zbl.Bakt.I.Orig. 186, 55-83 (1962)

MITCHELL, P.D.a.

R.G.BURRELL : Serology of the Mima-Herellea group and
the genus Moraxella.
J.Bact.87, 900-909 (1964)

PIÉCHAUD, D.et

PIÉCHAUD, M.et

L.SEGOND : Etude de 26 souches de Moraxella lwoffii.
Ann.Inst.Pasteur 80, 97-99 (1951)

PIÉCHAUD, D.et

M.PIÉCHAUD et

L.SEGOND : Variétés protéolytiques de Moraxella
lwoffii et de Moraxella glucidolytica
(Bacterium anitratum).
Ann.Inst.Pasteur 90, 517-526 (1956)

STENZEL, W. u.

W. MANNHEIM : On the classification and nomenclature of some nonmotile and coccoid diplobacteria, exhibiting the properties of Achromobacteriaceae.
Internat. Bull. Bact. Nomencl. 13, 195-200 (1963).

Lebenslauf

Als Tochter des Arztes Dr. Wilhelm Friederichs und seiner Ehefrau Elisabeth, geborene Harders, wurde ich am 30. Oktober 1941 in Albersdorf in Holstein geboren. Ostern 1948 wurde ich in die Volksschule in Unna eingeschult. Nach vier Jahren Volksschule bestand ich die Aufnahmeprüfung zur höheren Schule, die ich neun Jahre besuchte. Am 16. März 1961 legte ich die Reifeprüfung ab.

Ich begann das Studium der Zahnmedizin im Sommersemester 1961 in Würzburg und bestand dort am 28. April 1964 die zahnärztliche Vorprüfung. Im Wintersemester 1964/65 studierte ich in Freiburg und setzte dann mein Studium in Marburg fort, wo ich am 6. Februar 1967 das Staatsexamen beendete.

Im Herbst 1965 erhielt ich von Herrn Professor Dr. med. Siegert das Thema zu meiner Doktorarbeit. In ihrem experimentellen Teil konnte ich die Arbeit mit dem Beginn des Staatsexamens abschließen.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren
Professoren und Dozenten in:

Marburg:

Bommer, Gedigk, Heuser, Hennis, Hering,
Janke, Korb, Kottmeyer, Marx, Pantke,
Pfütz, Rodeck, Schiff, Schmid, Siegert,
Siess, Staib, Streicher;

Freiburg:

Beck, Eschler, Gattner, Haas, Heidenreich,
Petersen, Rehm, Schilli, Schirmeister,
Schreiber, Schuboth, Schumacher,
Thomssen, Wöhler;

Würzburg:

Altmann, Bauereisen, Briegleb, Freye, Hahn,
Hartmann, Krause, Klingmüller, Kulenkampff,
Kuschke, Müller, Naujoks, Neubert, Specht,
Roedig, Schantz, Scheer, Schiebler, Schlampp,
Schmeissner, Schroer, Turba, Wüstenfeld.

